

OBȚINEREA ȘI ANALIZA HPLC A UNUI EXTRACT CAROTENOIDIC DIN FRUCTE DE CĂȚINĂ ALBĂ (*HIPPOPHAE RHAMNOIDES*) CU UTILIZARE DERMATOLOGICĂ

OBTAINING OF AN SEABUCKTHORN (*HIPPOPHAE RHAMNOIDES*) BERRY CAROTENOIDIC EXTRACT AND HPLC ANALYSIS WITH DERMATOLOGICAL UTILISATION

**DUMBRAVĂ DELIA-GABRIELA¹, LUPEA ALFA-XENIA², HĂDĂRUGĂ
NICOLETA-GABRIELA¹, IANCULOV IOSIF³, CLEP CAMELIA¹**

¹Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului,
Facultatea de Tehnologia Produselor Agroalimentare, ²Universitatea
Politehnica Timișoara, Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria
Mediului, ³Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a
Banatului, Facultatea de Agricultură

Abstract. The paper presents a method for obtaining of an carotenoidic extract from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berry, the reverse phase-high presson liquid chromatography (RP-HPLC) analysis of this, and the mains dermatological effects of an ointment prepared with this extract, tested „ in vivo”.

Key words: carotenoids, HPLC analysis, seabuckthorn, extract, dermatological effect, ointment.

Carotenoidele sunt pigmenți neazotați, cu structură poliizoprenică, având o răspândire universală atât în regnul vegetal cât și în cel animal. Deoarece prezintă un număr mare de duble legături conjugate, acești pigmenți imprimă culoare galbenă portocalie sau roșie țesuturilor în care se găsesc. Datorită proprietăților lor biochimice deosebite (dintre care amintim: importanța în procesul vederii, în creștere, în reproducție, efectul anticancerigen, antioxidant, de regulatori ai sistemului de răspuns imunitar, eficiența deosebită în refacerea țesuturilor lezate, în cicatrizarea rănilor, în fotoprotecția pielii, etc.) acești pigmenți sunt utilizați tot mai mult în diverse domenii: medicină, zootehnie, agricultură, farmacie, industria alimentară, cosmetică [2,4].

Fructele de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) constituie o sursă bogată de pigmenți carotenoidici, în ele fiind prezente atât carotenoide hidrocarburice (α -caroten, β -caroten, licopen), cât și xantofile (zeaxantină, luteină, β -criptoxantină)[1].

Carotenoidele sunt cunoscute ca și agenți fotoprotectori, apărând de fotodistrugere numeroase substanțe biologice active existente în celule și țesuturi [7]. De asemenea, carotenoidele protejează celulele împotriva acțiunii nocive a oxigenului singlet și a speciilor radicalice oxidate, împiedicând peroxidarea lipidelor în lipozomi și exercitând o acțiune antioxidantă [3,10].

□-Carotenul aparține unei clase de antioxidanți biologici foarte eficienți în anularea radicalilor liberi la presiuni mici ale oxigenului, așa cum există în țesuturi în condiții fiziologice [4]. β-Carotenul își exercită activitatea antioxidantă prin adăugarea radicalilor peroxil la sistemele polienice. Carboradicalul centrat care se formează este stabilizat prin rezonanță și predomină asupra radicalilor peroxil.

Mai multe cercetări au evidențiat faptul că efectul fotoprotector și stabilizator al membranelor celulare exercitat de xantofile este mult mai pronunțat decât cel exercitat de carotenoidele hidrocarburice [5,6]. Pentru studii, Havoux a încorporat carotenoide în membrane lipozomale artificiale. Orientarea carotenoidelor în interiorul bistratului și deci influența lor asupra proprietăților termodinamice și mecanice ale membranei depinde de structura carotenoidelor individuale. □-Carotenul, de exemplu, rămâne în întregime în interiorul părții hidrocarbonate a membranei, fără vreo preferință de orientare bine definită, prezentând un grad ridicat de mobilitate. În cazul zeaxantinei, prezența grupelor hidroxilice la inele, a avut un efect puternic: zeaxantina este orientată în bistratul lipidic cu axa lungă a molecule aproape perpendiculară pe suprafața membranei [6].

Constatările experimentale realizate “*in vitro*” și “*in vivo*” au condus la ideea potrivit căreia carotenoidele pot servi la reglarea fluidității membranelor care nu conțin colesterol. Carotenoidele dihidroxilice se vor comporta ca niște “nituri” traversând întregul bistrat al membranei și legând împreună cele două jumătăți ale bistratului, în timp ce colesterolul poate acționa ca niște “cuie” inserate într-una din jumătățile bistratului lipidic [9].

Membranele care conțin carotenoide sunt protejate împotriva peroxidării lipidelor. Acest efect poate fi explicat prin binecunoscuta acțiune de antioxidanți preventivi a carotenoidelor. În plus, efectul de rigidizare al xantofilelor asupra membranelor este combinat cu o scădere a penetrării oxigenului molecular (O₂) în interiorul bistratului lipidic, iar acest efect este de o mare importanță în protecția împotriva degradării fotodinamice a lipidelor [6].

Toate aceste proprietăți ale carotenoidelor, care se găsesc din belșug în fructele de cătină albă, ne-au determinat să folosim acest material vegetal la obținerea unui extract carotenoidic din care am preparat un unguent terapeutic pe care l-am testat clinic în diferite afecțiuni dermatologice (ulcere de gambă, plăgi postelecrocauterizare, lupus eritematos cronic, epiteliom bazocelular, psoriazis și altele).

MATERIAL ȘI METODĂ

Ca materie primă pentru obținerea extractului carotenoidic s-a utilizat făină obținută din fructe uscate de cătină albă, soiul “Serpini 11”, provenite de la “Frutex S.A.” Bacău.

Pentru extracție s-a utilizat un amestec de eter de petrol:etanol 96% (8:2), ambii solvenți fiind de puritate analitică, provenind de la Chimopare București. În amestecul de solvenți s-au adăugat 0,2 g acid ascorbic. Solvenții folosiți pentru analiza HPLC, acetoneitril și acetat de etil, au fost achiziționați de la firma Merck&Co. Inc, New Jersey.

Carotenoidele standard folosite au provenit de la firma F. Hoffman – La Roche, Basel, Elveția.

◆ *Extracția și saponificarea*

Pentru obținerea extractului carotenoidic s-a cântărit o cantitate de 100,00 g făină din fructe de cătină albă și s-a supus extracției cu un amestec de eter de petrol:etanol 96% (8:2), în care s-au adăugat 0,2 g acid ascorbic pentru prevenirea oxidării carotenoidelor. Extracția s-a repetat de mai multe ori cu porțiuni proaspete de solvent până la epuizarea materialului vegetal.

Extractele reunite au fost concentrate sub vid la 35°C într-un evaporator rotativ model RV-05 bazic 1-B (Shimadzu, Japonia), până la consistența unui extract moale. Acest extract a fost supus în continuare saponificării cu 30 ml soluție de KOH 15% în etanol 96% la temperatura camerei și la întuneric timp de 16 ore. Frația nesaponificabilă a fost apoi extrasă cu eter de petrol și spălată de mai multe ori cu o soluție concentrată de clorură de sodiu și apoi cu apă până la completa îndepărtare a săpunurilor și alcaliilor.

Extractul eteric spălat a fost uscat peste Na₂SO₄ anhidru și apoi concentrat sub vid la 35°C până la obținerea unui extract uscat.

◆ *Analiza HPLC a extractului carotenoidic*

Extractul carotenoidic a fost dizolvat în acetat de etil și supus analizei HPLC cu fază inversă (RP-HPLC) într-un sistem format dintr-o coloană cromatografică cu fază inversă C18, Nucleosil ODS (250x4,6mm), 5 μm, pompă Kontron 322, detector Waters 990PDA, injector Rheodyne 7125 de 20 μl și software aferent pentru prelucrarea datelor.

Carotenoidele au fost separate la temperatura camerei folosind gradientul inițial 90%A+10%B, apoi de la 0-10 minute: 30%A+70%B, de la 10-40 minute: 10%A+90%B; A este un amestec de acetonitril:apă (9:1, v/v), iar B este acetat de etil.

Separarea a fost monitorizată la 450 nm; identificarea picurilor a fost stabilită comparând timpii de retenție HPLC și spectrele lor de absorbție în VIS cu cele ale carotenoidelor standard cunoscute.

Dozarea carotenoidelor totale s-a făcut spectrofotometric [6] utilizând un spectrofotometru UV-VIS model SHIMADZU 1240, Japonia.

Calculul s-a efectuat cu relația (1):

$$\text{Carotenoide totale } (\mu\text{g/g}) = A \times V \times 10^4 / A_{1\text{cm}}^{1\%} \times m \quad (1)$$

unde: A este absorbanța;

V – volumul total al extractului (ml);

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ - coeficient de absorbție al β-carotenului în eter de petrol (2592);

m – masa probei (g).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cromatograma HPLC a extractului carotenoidic saponificat din fructe de cătină (figura 1) relevă prezența a 6 carotenoide majore, așa cum se prezintă în tabelul 1.

Analizând datele din tabelul 1 se poate lesne constata preponderența cantitativă a hidrocarburilor carotenoidice în fructele de cătină albă, soiul Serpeni 11 (β-caroten, cis-β caroten, licopen: peste 70%) față de xantofile (luteină, zeaxantină, β-criptoxantină, 5,6-Epoxi-β-caroten).

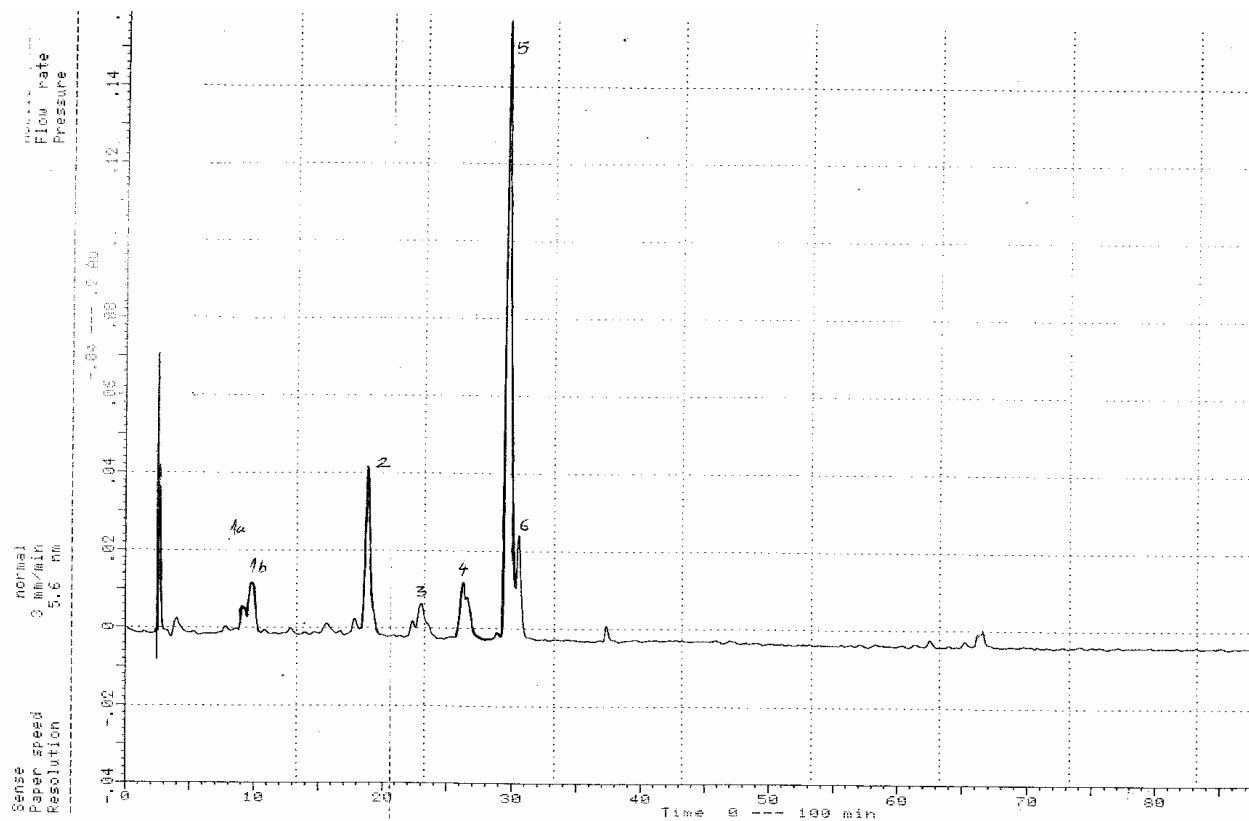


Fig. 1 – Cromatograma HPLC a extractului carotenoidic saponificat din fructe de cătină.

Tabelul 1

Carotenoidele majore identificate în extracul saponificat

Nr. pic	Procent arie	Timp de retenție t _R (min)	Identificare	Cantitate (μg/g făină cătină)
1	7,715	9,91 (1a) 9,65 (1b)	Luteină (1a) Zeaxantină (1b)	75,61
2	15,020	18,83	β-Criptoxantină	147,20
3	6,706	23,01	5,6-Epoxi-β-caroten	65,72
4	8,576	26,28	Licopen	84,04
5	54,103	29,67	β-Caroten (trans total)	530,22
6	7,878	30,57	cis-β-Caroten	77,21
Total carotenoides				980,00

Cu extractul carotenoidic obținut a fost preparat în laborator un unguent care a fost testat la Spitalul Clinic Municipal de Dermato-Venerologie – serviciul ambulator, Timișoara, în perioada 1 aprilie – 30 noiembrie 2004, pe un lot de 160 bolnavi (90 bărbați și 68 femei) cu vârste cuprinse între 18-70 ani.

A fost urmărită eficiența unguentului cu extract carotenoidic din fructe de cătină comparativ cu tratamentele uzuale în următoarele afecțiuni: ulcere de gambă atone (48 cazuri), plăgi porelectocauterizare (52 cazuri), lupus eritematos cronic localizat (4 cazuri), epiteliom bazocelular (3 cazuri), intertrigo mixt (3 cazuri), impetigo (12 cazuri), fotodermatoze (16 cazuri), psoriazis (10 cazuri), eczeme cronice (22 cazuri).

S-a remarcat eficiența deosebită ca epitelizant a unguentului în leziuni postelectroexcizie și în ulcere de gambă atone care nu răspundeau la tratamentul obișnuit. În lupus eritematos cronic, leziunile s-au vindecat cu 30% mai repede comparativ cu utilizarea locală a corticoizilor. În cazul eczemelor cronice și psoriazisului, unguentul a determinat dispariția în 2 zile a scuamelor, vindecarea leziunilor în 10-12 zile. Utilizarea acestui unguent cu extract carotenoidic din cătină albă nu a determinat efecte secundare ca: atrofii, telangectazii așa cum se observă în cazul tratamentului local cu corticoizi.

CONCLUZII

În urma cercetărilor efectuate se pot desprinde concluziile:

- Fructele de cătină albă (*Hippophae rhamnoides*) constituie o sursă bogată de carotenoides între care predomină β-carotenul, urmat de β-criptoxantină, licopen și cis-β-caroten. Sunt prezente în cantități relativ mari și luteina și zeaxantina, xantofile care alături de β-caroten exercită o acțiune deosebit de eficientă în dermatologie.
- Unguentul cu extract carotenoidic din fructe de cătină albă poate fi utilizat în afecțiuni dermatologice ca epitelizant, cicatrizant,

fotoprotector și cu bune efecte în tratamentul eczemelor cronice și al psoriazisului, fără efecte secundare nedorite.

BIBLIOGRAFIE

1. Beveridge T., Li T.S.C., Oomah B. D., Smith A., 1999 - J. Agr. Food Chem., 47, p 3480-3488.
2. Britton G., Liaaen-Jensen S. Pfander H., 1995 – *Carotenoids*. vol. 1A, Birkhäuser, Verlag, Basel, p 13-26.
3. Crăpățureanu S., Neamțu G., 1993 - *Progrese în Cercetarea Academică*. Academia Română, Filiala Cluj, p 201-204.
4. Crăpățureanu S., Neamțu G., 1997 - *St. cerc. Biochim.* 40, 1-2, p 61-79.
5. Gabrielska J., Gruszecki W.J., 1996 - *Biochem. Biophys. Acta.* 1285, p 167-170.
6. Havaux M., 1998 - *Trends in plant science.* 3, 4, p 147-151.
7. Neamțu G., 1991 - *St. cerc. biochim*, 34, 1-2, p 67-82.
8. Rodriguez-Amaya D.B., Kimura M., 2004 - *Harvetplus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus Technical Monograph 2, Washington D.C., p 36.
9. Subczynski W.K., 1992 - *Biochem. Biophys. Acta*, 1105, p 97-108.
10. Tămaș V., Borza A., 1993 - *St. cerc. Biochim.* 36, 1-2, p 129-138.